



## DELAYED-RELEASE MICROSPHERE AND ITS PRODUCTION AND USE

Abstract of JP 10273447 (A)

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain the subject microsphere useful for prevention and treatment for prostatic cancer and endometriosis by mixing under emulsifying a biologically active peptide except pantoic acid salt or its salt with pantoic acid by a polymer decomposable in vitro. **SOLUTION:** The objective microsphere having particle size of about 0.01-10  $\mu\text{m}$  in is obtained by mixing under emulsifying the solution containing about 1-25 wt.% of a polymer decomposable in vivo (e.g. an  $\alpha$ -lipoic-hydroxycarboxylic acid polymer, containing lactic acid/glycolic acid in the construction proportion of 100/0-40/60 mole % and having an average molecular weight of preferably 3,000-1,000,000) and about 1-25 wt.% of a physiologically active peptide (LH-RH agonist and antagonist) except pantoic acid salt or its salt in an organic solvent with the solution (e.g. methanolic solution) containing about 0.05-5 wt.% of pantoic acid or its alkali metal salt in the mixed solution followed by removal of the solvent by means of drying method in water and further by lyophilization when necessary.

Last updated: 12.10.2011      Worldwide Database      5.7.23.2: 93p

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-273447

(43) 公開日 平成10年(1998)10月13日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I	
A 6 1 K 38/00	A E E	A 6 1 K 37/02	A E E
9/52		9/52	A
38/22	A D U	47/46	
38/28	A C V	37/24	A D U
38/23	A C L	37/26	A C V
審査請求 未請求 請求項の数55 O L (全 19 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平10-14698	(71) 出願人	000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(22) 出願日	平成10年(1998)1月28日	(72) 発明者	亀井 茂 兵庫県宝塚市すみれ刃丘1丁目7番1-509号
(31) 優先権主張番号	特願平9-15203	(72) 発明者	太田 敦 大阪府池田市五月丘5丁目1番3号 武田薬品五月丘寮内
(32) 優先日	平9(1997)1月29日	(72) 発明者	岸川 彰 京都府長岡京市長岡2丁目2番45号 岩田ビル3F
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 朝日奈 忠夫 (外2名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 徐放性マイクロスフィア、その製造法および用途

(57) 【要約】

【課題】生理活性ペプチドを高含量で含有し、かつその放出速度を制御できる徐放性製剤を提供する。

【解決手段】生理活性ペプチドとパモ酸またはその塩とを生体内分解性ポリマーで乳化混合することを特徴とする徐放性マイクロスフィアの製造法、粒径約0.01～約10μmの生理活性ペプチドのパモ酸塩および生体内分解性ポリマーを含有する徐放性マイクロスフィア、生理活性ペプチド、パモ酸またはその塩および生体内分解性ポリマーの三者から成る複合体または塩を含有する徐放性マイクロスフィア、およびこれらマイクロスフィアを含有する徐放性製剤。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】生理活性ペプチドまたはその塩（ただし、パモ酸塩を除く）とパモ酸またはそのアルカリ金属塩とを生体内分解性ポリマーで乳化混合することを特徴とする徐放性マイクロスフィアの製造法。

【請求項2】生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液中で生理活性ペプチドまたはその塩（ただし、パモ酸塩を除く）の溶液とパモ酸またはそのアルカリ金属塩の溶液を乳化混合した後、溶媒を除去することを特徴とする請求項1記載の徐放性マイクロスフィアの製造法。

【請求項3】生理活性ペプチドまたはその塩（ただし、パモ酸塩を除く）、生体内分解性ポリマーおよびパモ酸またはそのアルカリ金属塩を有機溶媒に混合溶解した後、溶媒を除去することを特徴とする請求項1記載の製造法。

【請求項4】生理活性ペプチドまたはその塩（ただし、パモ酸塩を除く）および生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液とパモ酸またはそのアルカリ金属塩の溶液とを乳化混合した後、溶媒を除去することを特徴とする請求項1記載の製造法。

【請求項5】生体内分解性ポリマーおよびパモ酸またはそのアルカリ金属塩の有機溶媒溶液と生理活性ペプチドまたはその塩（ただし、パモ酸塩を除く）の溶液とを乳化混合した後、溶媒を除去することを特徴とする請求項1記載の製造法。

【請求項6】溶媒の除去を水中乾燥法で行う請求項2～5のいずれかに記載の製造法。

【請求項7】さらに凍結乾燥を行う請求項6記載の製造法。

【請求項8】混合液中の生理活性ペプチドの濃度が約1～約25重量％である請求項2～5にいずれかに記載の製造法。

【請求項9】混合液中の生体内分解性ポリマーの濃度が約1～約25重量％である請求項2～5にいずれかに記載の製造法。

【請求項10】混合液中のパモ酸またはその塩の濃度が約0.05～約5重量％である請求項2～5にいずれかに記載の製造法。

【請求項11】パモ酸またはその塩の溶液がパモ酸またはその塩のメタノール溶液である請求項2または4記載の製造法。

【請求項12】パモ酸またはその塩の溶液の使用量が、生理活性ペプチドおよび生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液に対して約2～約90体積％である請求項4記載の製造法。

【請求項13】生理活性ペプチドまたはその塩が遊離塩基または $pK_a$ 4.0以上の弱酸との塩である請求項1記載の製造法。

【請求項14】生理活性ペプチドが、パモ酸と塩を形成し得る塩基性基を有するペプチドである請求項1記載の

製造法。

【請求項15】生理活性ペプチドが、パモ酸と塩を形成し得る塩基性基を2個以上有するペプチドである請求項1記載の製造法。

【請求項16】生理活性ペプチドがLH-RHアゴニストである請求項1記載の製造法。

【請求項17】生理活性ペプチドがLH-RHアンタゴニストである請求項1記載の製造法。

【請求項18】生理活性ペプチドが5-oxo-Pro-His-Trp-Ser-Tyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NH-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>またはその塩である請求項1記載の製造法。

【請求項19】生理活性ペプチドが5-oxo-Pro-His-Trp-Ser-Tyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NH-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>の酢酸塩である請求項1記載の製造法。

【請求項20】生体内分解性ポリマーが $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸重合体である請求項1記載の製造法。

【請求項21】 $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸重合体が乳酸-グリコール酸重合体である請求項20記載の製造法。

【請求項22】乳酸とグリコール酸との組成比が100/0～40/60（モル％）である請求項21記載の製造法。

【請求項23】重合体の重量平均分子量が3,000～100,000である請求項20記載の製造法。

【請求項24】生体内分解性ポリマーがポリ乳酸である請求項1記載の製造法。

【請求項25】ポリ乳酸の重量平均分子量が10,000～60,000である請求項24記載の製造法。

【請求項26】有機溶媒がジクロロメタンである請求項2～5のいずれかに記載の製造法。

【請求項27】生理活性ペプチドがパモ酸と塩を形成し得る塩基性基を1個有する生理活性ペプチドであり、徐放性マイクロスフィアが粒径約0.01～約10 $\mu$ mの生理活性ペプチドのパモ酸塩を含有する徐放性マイクロスフィアである請求項1記載の製造法。

【請求項28】生理活性ペプチドがパモ酸と塩を形成し得る塩基性基を2個以上有する生理活性ペプチドであり、徐放性マイクロスフィアが生理活性ペプチド、生体内分解性ポリマーおよびパモ酸またはその塩の三者から形成される複合体または塩を含有する徐放性マイクロスフィアである請求項1記載の製造法。

【請求項29】請求項1記載の製造法で製造され得る徐放性マイクロスフィア。

【請求項30】粒径約0.01～約10 $\mu$ mの生理活性ペプチドのパモ酸塩および生体内分解性ポリマーを含有することを特徴とする徐放性マイクロスフィア。

【請求項31】生理活性ペプチド、パモ酸またはその塩および生体内分解性ポリマーの三者から形成される複合体または塩を含有することを特徴とする徐放性マイクロスフィア。

【請求項32】生理活性ペプチド1モルに対してパモ酸

を約0.8モル以下の割合で含有することを特徴とする徐放性マイクロスフィア。

【請求項33】生理活性ペプチド1モルに対してパモ酸を約0.3～約0.7モルの割合で含有する請求項32記載の徐放性マイクロスフィア。

【請求項34】生理活性ペプチドが $pK_a$ 4.0以上の弱酸と塩を形成し得る塩基性基を有する生理活性ペプチドである請求項29～32のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィア。

【請求項35】生理活性ペプチドがパモ酸と塩を形成し得る塩基性基を有する生理活性ペプチドである請求項29～32のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィア。

【請求項36】生理活性ペプチドがパモ酸と塩を形成し得る塩基性基を2個以上有する生理活性ペプチドである請求項29～32のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィア。

【請求項37】生理活性ペプチドがLH-RHアンタゴニストである請求項29～32のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィア。

【請求項38】生理活性ペプチドがLH-RHアゴニストである請求項29～32のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィア。

【請求項39】生理活性ペプチドが5-oxo-Pro-His-Trp-Ser-Tyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NH-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>またはその塩である請求項29～32のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィア。

【請求項40】生理活性ペプチドが5-oxo-Pro-His-Trp-Ser-Tyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NH-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>の酢酸塩である請求項29～32のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィア。

【請求項41】生体内分解性ポリマーが $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸重合体である請求項29または31記載の徐放性マイクロスフィア。

【請求項42】 $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸重合体が乳酸-グリコール酸重合体である請求項41記載の徐放性マイクロスフィア。

【請求項43】乳酸とグリコール酸との組成比が100/0～40/60(モル%)である請求項42記載の徐放性マイクロスフィア。

【請求項44】重合体の重量平均分子量が3,000～100,000である請求項41記載の徐放性マイクロスフィア。

【請求項45】生体内分解性ポリマーがポリ乳酸である請求項29～32のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィア。

【請求項46】ポリ乳酸の重量平均分子量が10,000～60,000である請求項45記載の徐放性マイクロスフィア。

【請求項47】徐放性マイクロスフィアにおける生理活性ペプチドの割合が約15～約85重量%である請求項

29～32のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィア。

【請求項48】徐放性マイクロスフィアにおけるパモ酸またはその塩の割合が約0.1～約25重量%である請求項29～32のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィア。

【請求項49】徐放性マイクロスフィアにおける生体内分解性ポリマーの割合が約15～約85重量%である請求項29～32のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィア。

【請求項50】徐放性マイクロスフィアにおける粒径約0.01～約10 $\mu$ mの生理活性ペプチドのパモ酸塩の割合が約15～約95重量%である請求項30記載の徐放性マイクロスフィア。

【請求項51】生理活性ペプチドが5-oxo-Pro-His-Trp-Ser-Tyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NH-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>またはその塩であり、徐放性マイクロスフィアにおける該生理活性ペプチドの含有量が約15～約30重量%である請求項29～32のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィア。

【請求項52】請求項29～32のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィアを含有する徐放性製剤。

【請求項53】注射用である請求項52記載の徐放性製剤。

【請求項54】請求項37または38記載の徐放性マイクロスフィアを含有する徐放性製剤。

【請求項55】前立腺癌、前立腺肥大症、子宮内膜症、子宮筋腫、子宮線維腫、思春期早発症または乳癌の予防・治療剤または避妊剤である請求項54記載の徐放性製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生理活性ペプチドを含有する徐放性マイクロスフィア、該マイクロスフィアを含有する徐放性製剤およびその製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】生理活性ペプチドの徐放性マイクロスフィア化技術については、従来より種々の方法が報告されている。例えば、特開平7-97334号公報にはLH-RHアンタゴニスト活性を有する生理活性ペプチドまたはその塩と末端に遊離のカルボキシル基を有する生体内分解性ポリマーとからなる徐放性製剤およびその製造法が開示されている。特開平1-121222号および特開平3-66625号には、パモ酸、タンニン酸、ステアリン酸等の非毒性の水不溶性酸を用いて変換したLH-RHの誘導体等の水溶性ペプチドの水不溶性付加塩等とポリラクチド、乳酸とグリコール酸とのコポリマーのようなポリマーとからなる放出制御薬剤組成物およびその製造法が記載されており、25mg/1以下の蒸留水中への溶解度を水不溶性と定義して水不溶性とするこ

とにより持続性が向上することが示唆されている。特開平3-68511号には、ポリマー基剤を薬物化合物が溶解しない溶媒に溶解した溶液中に、薬物溶液を添加分散させてマイクロ粒剤を形成させ、これに水中油型乳濁液を添加することにより、マイクロ粒剤を硬化させる徐放性マイクロ粒剤の製造法およびこれにより得られるソマトスタチンやその誘導体のマイクロ粒剤を記載している。さらに、該薬剤中でソマトスタチン誘導体であるオクトレチドの安定な塩としてパモ酸塩を用いることを示唆している。特開平5-221855号公報には、予め水溶性ペプチドを水不溶性ペプチドに変換した後、O/W型乳化物を調製し、水溶液中の過剰のポリマー材料用有機溶媒を濃縮することにより、該ペプチドを封入した生体内分解性ポリマー材料からなるマイクロスフィアの形で得られるペプチドの徐放制御医薬組成物の製造方法が開示されている。さらには、特開平6-340543号公報にはラクチド/グリコリドモル比が100:0~40:60、分子量が10,000~200,000、分散度が1.7~3.0であるポリラクチドのマトリックス中に、ペプチドのエンボン酸（パモ酸）またはアスコルビン酸塩を活性成分として含む徐放性製剤が記載されており、エンボン酸やアスコルビン酸がポリラクチド類中のペプチドの安定化剤として有用であると示唆している。WO95/15767号公報にはセトロレリクス（cetorelix）（LH-RHアンタゴニスト）のエンボン酸塩（パモ酸塩）（粒径が主に5 $\mu$ m~200 $\mu$ m）およびその製造法が記載されており、この塩でのLH-RHアンタゴニスト作用の持続時間は、この塩を生体内分解性ポリマーに封入させた製剤のそれと変わらないことが記述されている。このように、医薬品組成物中の生理活性ペプチドの安定化あるいは放出性を制御する目的で形成させた生理活性ペプチドのパモ酸塩を医薬品組成物中に含有させることは知られていたが、生体内分解性ポリマー共存下で生理活性ペプチドの微細なパモ酸塩を形成させた組成物あるいは生理活性ペプチド、パモ酸および生体内分解性ポリマーの三者から成る塩およびこれを含有する組成物については全く報告されていない。また、これらの文献記載の方法で得られる徐放性製剤は、臨床適用を考慮した場合に、十分に満足できるものではない。

#### 【0003】

【発明が解決しようとする課題】生理活性ペプチドを高含量で含有し、かつその放出速度を制御できる徐放性製剤およびその製造法を提供する。

#### 【0004】

【課題を解決するための手段】上記の問題点を解決するために鋭意研究した結果、生理活性ペプチドとパモ酸またはその塩とを生体内分解性ポリマーで乳化混合することによって、生理活性ペプチドを高含量で含有し、その放出速度を制御できる徐放性マイクロスフィアを製造で

きることを見いだした。より具体的には、従来のように予め生理活性ペプチドのパモ酸塩を製造する方法とは異なり、パモ酸と塩を形成し得る塩基性基を有する生理活性ペプチド、パモ酸またはその塩および生体内分解性ポリマーを分子分散状態あるいはそれに近似の溶液状態で乳化混合することによって粒径約0.01~約10 $\mu$ m程度の生理活性ペプチドの微細なパモ酸塩を溶媒を除去するまでに形成させ、これを含有するマイクロスフィアを製造した場合、高含量で生理活性ペプチドを取り込めることを見いだした。また、該塩基性基を2個以上有するペプチドの場合には、生理活性ペプチドにパモ酸と遊離のカルボキシル基を有する生体内分解性ポリマーの両者に対しての複合体または塩を形成させ、これを含有するマイクロスフィアを調製した場合には、予め調製した生理活性ペプチドのパモ酸塩を含有させる従来法でのマイクロスフィアとは異なったパモ酸/生理活性ペプチド比率となり、同時に生体内分解性ポリマーの分解速度によって生理活性ペプチドの放出速度を制御可能であることを見いだした。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0005】すなわち、本発明は、（1）生理活性ペプチドまたはその塩（ただし、パモ酸塩を除く）とパモ酸またはそのアルカリ金属塩とを生体内分解性ポリマーで乳化混合することを特徴とする徐放性マイクロスフィアの製造法、（2）生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液中で生理活性ペプチドまたはそのアルカリ金属塩（ただし、パモ酸塩を除く）の溶液とパモ酸またはその塩の溶液を乳化混合した後、溶媒を除去することを特徴とする第（1）項記載の徐放性マイクロスフィアの製造法、

（3）生理活性ペプチドまたはその塩（ただし、パモ酸塩を除く）、生体内分解性ポリマーおよびパモ酸またはそのアルカリ金属塩を有機溶媒に混合溶解した後、溶媒を除去することを特徴とする第（1）項記載の製造法、

（4）生理活性ペプチドまたはその塩（ただし、パモ酸塩を除く）および生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液とパモ酸またはそのアルカリ金属塩の溶液とを乳化混合した後、溶媒を除去することを特徴とする第（1）項記載の製造法、（5）生体内分解性ポリマーおよびパモ酸またはそのアルカリ金属塩の有機溶媒溶液と生理活性ペプチドまたはその塩（ただし、パモ酸塩を除く）の溶液とを乳化混合した後、溶媒を除去することを特徴とする第（1）項記載の製造法、（6）溶媒の除去を水中乾燥法で行う第（2）項~第（5）項のいずれかに記載の製造法、（7）さらに凍結乾燥を行う第（6）項記載の製造法、（8）混合液中の生理活性ペプチドの濃度が約1~約25重量%である第（2）項~第（5）項のいずれかに記載の製造法、（9）混合液中の生体内分解性ポリマーの濃度が約1~約25重量%である第（2）項~第（5）項のいずれかに記載の製造法、（10）混合液中

のパモ酸またはその塩の濃度が約0.05～約5重量%である第(2)項～第(5)項のいずれかに記載の製造法、(11)パモ酸またはその塩の溶液がパモ酸またはその塩のメタノール溶液である第(2)項または第

(4)項記載の製造法、(12)パモ酸またはその塩の溶液の使用量が、生理活性ペプチドおよび生体内分解ポリマーの有機溶媒溶液に対して約2～約90体積%である第(4)項記載の製造法、(13)生理活性ペプチドまたはその塩が遊離塩基または $pK_a4.0$ 以上の弱酸との塩である第(1)項記載の製造法、(14)生理活性ペプチドが、パモ酸と塩を形成し得る塩基性基を有するペプチドである第(1)項記載の製造法、(15)生理活性ペプチドが、パモ酸と塩を形成し得る塩基性基を2個以上有するペプチドである第(1)項記載の製造法、

【0006】(16)生理活性ペプチドが $LH-RH$ アゴニストである第(1)項記載の製造法、(17)生理活性ペプチドが $LH-RH$ アンタゴニストである第

(1)項記載の製造法、(18)生理活性ペプチドが5-oxo-Pro-His-Trp-Ser-Tyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NH-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>またはその塩である第(1)項記載の製造法、(19)生理活性ペプチドが5-oxo-Pro-His-Trp-Ser-Tyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NH-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>の酢酸塩である第(1)項記載の製造法、

(20)生体内分解性ポリマーが $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸重合体である第(1)項記載の製造法、(21) $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸重合体が乳酸-グリコール酸重合体である第(20)項記載の製造法、(22)乳酸とグリコール酸との組成比が100/0～40/60(モル%)である第(21)項記載の製造法、(23)重合体の重量平均分子量が3,000～100,000である第(20)項記載の製造法、(24)生体内分解性ポリマーがポリ乳酸である第(1)項記載の製造法、(25)ポリ乳酸の重量平均分子量が10,000～60,000である第(24)項記載の製造法、(26)有機溶媒がジクロロメタンである第(2)項～第(5)項のいずれかに記載の製造法、(27)生理活性ペプチドがパモ酸と塩を形成し得る塩基性基を1個有する生理活性ペプチドであり、徐放性マイクロスフィアが粒径約0.01～約10 $\mu m$ の生理活性ペプチドのパモ酸塩を含有する徐放性マイクロスフィアである第(1)項記載の製造法、

(28)生理活性ペプチドがパモ酸と塩を形成し得る塩基性基を2個以上有する生理活性ペプチドであり、徐放性マイクロスフィアが生理活性ペプチド、生体内分解性ポリマーおよびパモ酸またはその塩の三者から形成される複合体または塩を含有する徐放性マイクロスフィアである第(1)項記載の製造法、

【0007】(29)第(1)項記載の製造法で製造され得る徐放性マイクロスフィア、(30)粒径約0.01～約10 $\mu m$ の生理活性ペプチドのパモ酸塩および生

体内分解性ポリマーを含有することを特徴とする徐放性マイクロスフィア、(31)生理活性ペプチド、パモ酸またはその塩および生体内分解性ポリマーの三者から形成される複合体または塩を含有することを特徴とする徐放性マイクロスフィア、(32)生理活性ペプチド1モルに対してパモ酸を約0.8モル以下の割合で含有することを特徴とする徐放性マイクロスフィア、(33)生理活性ペプチド1モルに対してパモ酸を約0.3～約0.7モルの割合で含有する第(32)項記載の徐放性マイクロスフィア、(34)生理活性ペプチドが $pK_a4.0$ 以上の弱酸と塩を形成し得る塩基性基を有する生理活性ペプチドである第(29)項～第(32)項のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィア、(35)生理活性ペプチドがパモ酸と塩を形成し得る塩基性基を有する生理活性ペプチドである第(29)項～第(32)項のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィア、(36)生理活性ペプチドがパモ酸と塩を形成し得る塩基性基を2個以上有する生理活性ペプチドである第(29)項～第(32)項のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィア、(37)生理活性ペプチドが $LH-RH$ アンタゴニストである第(29)項～第(32)項のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィア、(38)生理活性ペプチドが $LH-RH$ アゴニストである第(29)項～第(32)項のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィア、

【0008】(39)生理活性ペプチドが5-oxo-Pro-His-Trp-Ser-Tyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NH-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>またはその塩である第(29)項～第(32)項のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィア、(40)生理活性ペプチドが5-oxo-Pro-His-Trp-Ser-Tyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NH-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>の酢酸塩である第(29)項～第(32)項のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィア、(41)生体内分解性ポリマーが $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸重合体である第(29)項または第(31)項記載の徐放性マイクロスフィア、(42) $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸重合体が乳酸-グリコール酸重合体である第(41)項記載の徐放性マイクロスフィア、(43)乳酸とグリコール酸との組成比が100/0～40/60(モル%)である第(42)項記載の徐放性マイクロスフィア、(44)重合体の重量平均分子量が3,000～100,000である第(41)項記載の徐放性マイクロスフィア、(45)生体内分解性ポリマーがポリ乳酸である第(29)項～第(32)項のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィア、(46)ポリ乳酸の重量平均分子量が10,000～60,000である第(45)項記載の徐放性マイクロスフィア、

【0009】(47)徐放性マイクロスフィアにおける生理活性ペプチドの割合が約15～約85重量%である第(29)項～第(32)項のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィア、(48)徐放性マイクロスフィアに

におけるパモ酸またはその塩の割合が約0.1～約25重量%である第(29)項～第(32)項のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィア、(49)徐放性マイクロスフィアにおける生体内分解性ポリマーの割合が約15～約85重量%である第(29)項～第(32)項のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィア、(50)徐放性マイクロスフィアにおける粒径約0.01～約10 $\mu$ mの生理活性ペプチドのパモ酸塩の割合が約15～約95重量%である第(30)項記載の徐放性マイクロスフィア、(51)生理活性ペプチドが5-oxo-Pro-His-Trp-Ser-Tyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NH-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>またはその塩であり、徐放性マイクロスフィアにおける該生理活性ペプチドの含有量が約15～約30重量%である第(29)項～第(32)項のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィア、(52)第(29)項～第(32)項のいずれかに記載の徐放性マイクロスフィアを含有する徐放性製剤、(53)注射用である第(52)項記載の徐放性製剤、(54)第(37)項または第(38)項記載の徐放性マイクロスフィアを含有する徐放性製剤、および(55)前立腺癌、前立腺肥大症、子宮内膜症、子宮筋腫、子宮線維腫、思春期早発症または乳癌の予防・治療剤または避妊剤である第(54)項記載の徐放性製剤を提供する。

【0010】本発明の製造法に用いられる生理活性ペプチドは、生理活性を示すペプチドでパモ酸と塩を形成可能なペプチドであればいかなるものでもよく、例えば、分子量が約300～約40,000、好ましくは分子量約400～約30,000、さらに好ましくは分子量が約500～約20,000であるペプチドなどが用いられる。このような生理活性ペプチドとしては、例えば、pKa4.0以上の弱酸(例、炭酸、重炭酸、ホウ酸、炭素数が1～3の低級アルカンモノカルボン酸等)と塩を形成しうる塩基性基を有していることが好ましい。該生理活性ペプチドが分子内に複数の塩基性基を有する場合には、少なくとも1個以上の塩基性基がパモ酸と塩を形成可能であればよく、他の基は塩を形成していてもよい。また、塩基性基以外に遊離のあるいは塩を形成した酸性基を有するものであっても、パモ酸との塩を形成しうる限り、本発明に用いられる生理活性ペプチドの範囲内である。

【0011】生理活性ペプチドの活性として代表的なものとしては、ホルモン作用が挙げられる。また、該生理活性ペプチドは天然物、合成物、半合成物、遺伝子工学の産物のいずれでもよいし、さらにこれらの類縁体及び／又は誘導体でもよい。これらの生理活性ペプチドの作用機作は、作動性あるいは拮抗性のいずれでもよい。該生理活性ペプチドとしては、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LH-RHまたはゴナドトロピン放出ホルモン、Gn-RHと称されることもある。)、インスリン、ソマトスタチン、ソマトスタチン誘導体(例、サンドスタ

チン; USP4,087,390, 4,093,574, 4,100,117および4,253,998)、成長ホルモン(GH)、成長ホルモン放出ホルモン(GH-RH)、プロラクチン、エリスロポイエチン(EPO)、副腎皮質ホルモン(ACTH)、ACTH誘導体(例、エビラチド)、メラノサイト刺激ホルモン(MSH)、甲状腺ホルモン放出ホルモン((pyr)Glu-His-ProNH<sub>2</sub>; TRH)、その塩および誘導体(特開昭50-121273号公報、特開昭52-116465号公報)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、黄体形成ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、バソプレシン、バソプレシン誘導体(例、デスモプレシン)、オキシトシン、カルシトニン、グルカゴン、ガストリン、セクレチン、パンクレオザイミン、コレシストキニン、アンジオテンシン、ヒト胎盤ラクトゲン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(HCG)、エンケファリン、エンケファリン誘導体(例、USP4,277,394、EP-31567)、エンドルフィン、キョウトルフィン、インターフェロン(例、インターフェロン- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )、インターロイキン(例、インターロイキン1～12各種)、タフトシン、サイモポイエチン、サイモシン、サイモチムリン、胸腺液性因子(THF)、血中胸腺因子(FTS)およびその誘導体(USP4,229,438)、腫瘍壊死因子(TNF)、コロニー誘導因子(例、CSF, GCSF, GMCSF, MCSF)、モチリン、デイノルフィン、ボンベシン、ニューロテンシン、セルレイン、ブラジキニン、心房性ナトリウム排泄増加因子、神経成長因子(NGF)、細胞増殖因子(例、EGF, TGF- $\beta$ , PDGF、酸性FGF、塩基性FGF)、神経栄養因子(例、NT-3, NT-4, CNTF, GDNF, BDNF)、エンドセリン拮抗作用を有するペプチド類およびその類縁体(誘導体)(EP-436189, EP-457195, EP-496452, 特開平3-94692号公報、特開平3-130299号公報)、インスリンレセプター、インスリン様成長因子(IGF)-1レセプター、IGF-2レセプター、トランスフェリンレセプター、エピダーマル成長因子レセプター、ローデンシシティリポプロテイン(LDL)レセプター、マクロファージスカベンジャーレセプター、GLUT-4トランスポーター、成長ホルモンレセプター、レプチンレセプターの内在化を阻害する活性を有するMHC-I (major histocompatibility class I antigen complex)の $\alpha$ 1ドメイン由来のペプチド(プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンスズ・オブ・ユーエスエー(Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America)、第91巻、9086-9090頁(1994年); 同第94巻、11692-11697頁(1997年))およびその類縁体(誘導体)、さらにはこれらのフラグメントまたはフラグメントの誘導体などが挙げられる。

【0012】生理活性ペプチドが塩である場合、薬理学



的に享受しうる塩などが挙げられる。例えば、該生理活性ペプチドが分子内にアミノ基等の塩基性基を有する場合、該塩基性基と無機酸（例、塩酸、硫酸、硝酸、ホウ酸等）、有機酸（例、炭酸、重炭酸、コハク酸、酢酸、プロピオン酸、トリフルオロ酢酸等）等との塩などが挙げられる。また、生理活性ペプチドが分子内にカルボキシル基等の酸性基を有する場合、無機塩基（例、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属、カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属など）や有機塩基（例、トリエチルアミン等の有機アミン類、アルギニン等の塩基性アミノ酸類等）等との塩などが挙げられる。また、生理活性ペプチドは金属錯体化合物（例、銅錯体、亜鉛錯体等）を形成していてもよい。ただし、本発明の製造法において原料として用いられる生理活性ペプチドの塩から、生理活性ペプチドのパモ酸塩は除かれる。本発明に用いられる生理活性ペプチドの好ましい具体例としては、例えば、前立腺癌、前立腺肥大症、子宮内膜症、子宮筋腫、子宮線維腫、思春期早発症、乳癌等のLH-RHあるいはこれにより誘導されるホルモンに依存性の疾患および避妊に対して有効なLH-RH類縁体およびその塩、成長ホルモンおよびこれにより誘導されるホルモン依存性の疾患や消化性潰瘍等の消化器系の疾患等に対して有効なソマトスタチン誘導体およびその塩などが挙げられる。前記LH-RH類縁体またはその塩の具体例は、例えば、トリートメント ウィズ GnRH アナログス：コントラバーシス アンド パースペクティブ（Treatment with GnRH analogs: Controversies and perspectives）〔パルテノンパブリッシング グループ（株）（The Parthenon Publishing Group Ltd.）発行1996年〕、特表平3-503165号公報、特開平3-101695号、同7-97334号及び同8-259460号公報などに記載されているペプチド類が挙げられる。

【0013】LH-RH拮抗作用を有する生理活性ペプ

さらにソマトスタチン類縁体のうちの腫瘍に選択的に有効なソマトスタチン誘導体の具体例を挙げれば、例えば  $\text{D Phe}-\text{Cys}-\text{Tyr}-\text{D Trp}-\text{Lys}-\text{Cys}-\text{TirNH}_2$  など米国特許5,480,870号公報あるいはEP 0505680号公報記載の生理活性ペプチドおよびその塩が挙げられる。

また、サンドスタチン（USP4087390, 4093574, 4100117, 4253998）なども好適である。

【0015】パモ酸と塩を形成し得る塩基性基を1個有する生理活性ペプチドのより好ましい具体例としては、例えば、前述の一般式〔I b〕で表されるLH-RH作動作用を有する生理活性ペプチドまたはその塩が挙げられる。パモ酸と塩を形成し得る塩基性基を2個以上有する生理活性ペプチドのより好ましい具体例としては、例えば、前述の一般式〔I a〕で表されるLH-RH拮抗

略号

名称

チドのより好ましい具体例としては、例えば、一般式〔I a〕

$\text{X}-\text{D2Na1}-\text{D4ClPhe}-\text{D3Pal}-\text{Ser}-\text{A}-\text{B}-\text{Leu}-\text{C}-\text{Pro}-\text{DAlaNH}_2$

〔式中XはN(4H2-furoyl) GlyまたはNAcを、AはNMeTyr、Tyr、Aph (Atz)、NMeAph (Atz) から選ばれる残基を、BはDLys (Nic)、DCit、DLys (AzaglyNic)、DLys (AzaglyFur)、DhArg (Et<sub>2</sub>)、DAph (Atz)、DhCi から選ばれる残基を、CはLys (Nisp)、Arg、hArg (Et<sub>2</sub>) をそれぞれ示す〕で表される生理活性ペプチドまたはその塩が挙げられる。さらには、米国特許5,580,957号公報などに記載の生理活性ペプチドまたはその塩がより好ましい具体例として挙げられる。これらのペプチドは、前記文献あるいは公報記載の方法あるいはこれに準じる方法で製造することができる。LH-RH作動作用を有する生理活性ペプチドのより好ましい具体例としては、例えば、一般式〔I b〕

$5\text{-oxo-Pro-His-Trp-Ser-Tyr-Y-Leu-Arg-Pro-Z}$

〔式中、YはDLeu、DAla、DTrp、DSer (tBu)、D2Na1、DHis (ImBzl) から選ばれる残基を、ZはNH-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>またはGly-NH<sub>2</sub>をそれぞれ示す〕で表される生理活性ペプチドまたはその塩が挙げられる。なかでも、YがDLeuで、ZがNH-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>であるペプチドが好適である。これらのペプチドは、前記文献あるいは公報記載の方法あるいはこれに準じる方法で製造することができる。

【0014】また、ソマトスタチン誘導体またはその塩の具体例としては、例えば、プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA, 93巻, 12513-12518 頁 (1996年) あるいは該文献中に引用された文献中などに記載されている。

【化1】

作用を有する生理活性ペプチドまたはその塩が挙げられるが、前述の一般式〔I b〕で表される生理活性ペプチドまたはその塩も同様に用いることができる。特に、本発明に用いられる生理活性ペプチドとしては、例えば、5-oxo-Pro-Ile-Trp-Ser-Tyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NH-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> またはその塩（特に、酢酸塩）が好適である。

【0016】本明細書中で使用される略号としては、



N(4H2-furoyl) Gly	: N-テトラヒドロフロイルグリシン残基
NAc	: N-アセチル基
D2Nal	: D-3-(2-ナフチル)アラニン残基
D4C1Phe	: D-3-(4-クロロフェニル)アラニン残基
D3Pal	: D-3-(3-ピリジル)アラニン残基
NMeTyr	: N-メチルチロシン残基
Aph (Atz)	: N-[5'-(3'-アミノ-1'H-1', 2', 4'-トリアゾリル)]フェニルアラニン残基
NMeAph (Atz)	: N-メチル-[5'-(3'-アミノ-1'H-1', 2', 4'-トリアゾリル)]フェニルアラニン残基
DLys (Nic)	: D-(ε-N-ニコチノイル)リシン残基
DCit	: D-シトルリン残基
DLys (AzaglyNic)	: D-(アザグリシルニコチノイル)リシン残基
DLys (AzaglyFur)	: D-(アザグリシルフラニル)リシン残基
DhArg (Et <sub>2</sub> )	: D-(N,N'-ジエチル)ホモアルギニン残基
DAph (Atz)	: D-N-[5'-(3'-アミノ-1'H-1', 2', 4'-トリアゾリル)]フェニルアラニン残基
DhCi	: D-ホモシトルリン残基
Lys (Nisp)	: (ε-N-イソプロピル)リシン残基
hArg (Et <sub>2</sub> )	: (N,N'-ジエチル)ホモアルギニン残基
DSer (tBu)	: D-(O-tert-ブチル)セリン残基
DHis (ImBzl)	: D-(π-ベンジル)ヒスチジン残基

【0017】その他アミノ酸に関し、略号で表示する場合、IUPAC-IUBコミッション・オブ・バイオケミカル・ノーメンクレチャー (Commission on Biochemical Nomenclature) (ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (European Journal of Biochemistry) 第138巻、9~37頁 (1984年)) による略号あるいは該当分野における慣用略号に基づくものとし、また、アミノ酸に関して光学異性体がありうる場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

【0018】本発明の製造法に用いられる好ましい生体内分解性ポリマーの具体例としては、例えば、α-ヒドロキシカルボン酸類 (例、グリコール酸、乳酸、ヒドロキシ酪酸等)、ヒドロキシジカルボン酸類 (例、リンゴ酸)、ヒドロキシトリカルボン酸 (例、クエン酸) 等の1種以上から合成され、遊離のカルボキシル基を有する重合体、共重合体、あるいはこれらの混合物、ポリ-α-シアノアクリル酸エステル、ポリアミノ酸 (例、ポリ-γ-ベンジル-L-グルタミン酸等)、無水マレイン酸系共重合体 (例、スチレン-マレイン酸共重合体等) 等が挙げられる。ポリマーにおける重合の形式は、ランダム、ブロック、グラフトのいずれでもよい。また、上記α-ヒドロキシカルボン酸類、ヒドロキシジカルボン酸類、ヒドロキシトリカルボン酸類が分子内に光学活性中心を有する場合、D-体、L-体およびDL-体のいずれも用いることができる。これらの中でも乳酸-グリコール酸重合体、ポリ-α-シアノアクリル酸エステルが好ましい。さらに好ましくは、乳酸-グリコール酸重

合体である。

【0019】生体内分解性ポリマーは、好ましくは (A) グリコール酸と一般式

【化2】



(式中、Rは炭素数2から8のアルキル基を表す) で示されるヒドロキシカルボン酸との共重合体および (B) ポリ乳酸を混合した生体内分解性ポリマーまたは乳酸とグリコール酸との共重合体である。一般式〔II〕中、Rで示される炭素数2から8の直鎖もしくは分枝状のアルキル基としては、例えば、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、tert-ペンチル、1-エチルプロピル、ヘキシル、イソヘキシル、1,1-ジメチルブチル、2,2-ジメチルブチル、3,3-ジメチルブチル、2-エチルブチルなどが挙げられる。好ましくは、炭素数2から5の直鎖もしくは分枝状のアルキル基が用いられる。具体例としては、例えば、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチルなどが挙げられる。特に好ましくは、Rはエチルである。

【0020】一般式〔II〕で示されるヒドロキシカルボン酸としては、例えば、2-ヒドロキシ酪酸、2-ヒドロキシ吉草酸、2-ヒドロキシ-3-メチル酪酸、2-ヒドロキシカプロン酸、2-ヒドロキシイソカプロン酸、2-ヒドロキシカプリン酸などが挙げられる。この

うち特に、2-ヒドロキシ酪酸、2-ヒドロキシ吉草酸、2-ヒドロキシ-3-メチル酪酸、2-ヒドロキシカプロン酸が好ましい。一般式〔II〕で示されるヒドロキシカルボン酸は、特に好ましくは2-ヒドロキシ酪酸である。これらのヒドロキシカルボン酸はD-体、L-体およびD、L-体の何れでもよいが、D-体/L-体（モル％）が約75/25～約25/75の範囲のものが好ましい。さらに好ましくは、D-体/L-体（モル％）が約60/40～約40/60の範囲のヒドロキシカルボン酸である。特に好ましくは、D-体/L-体（モル％）が約55/45～約45/55の範囲のヒドロキシカルボン酸である。

【0021】グリコール酸と一般式〔II〕で示されるヒドロキシカルボン酸との共重合体（以下、グリコール酸共重合体と略称する）において、共重合の形式は、ランダム、ブロック、グラフトの何れでもよい。好ましくは、ランダム共重合体である。一般式〔II〕で示されるヒドロキシカルボン酸は、1種または2種以上適宜の割合で用いてもよい。上記（A）のグリコール酸共重合体におけるグリコール酸と一般式〔II〕で示されるヒドロキシカルボン酸との組成比は、グリコール酸が約10～約75モル％、残りがヒドロキシカルボン酸である場合が好ましい。さらに好ましくは、グリコール酸が約20～約75モル％、残りがヒドロキシカルボン酸である場合である。特に好ましくは、グリコール酸が約40～約70モル％、残りがヒドロキシカルボン酸である場合である。これらグリコール酸共重合体は、重量平均分子量が2,000から100,000のものが用いられる。好ましくは、重量平均分子量が3,000から80,000の共重合体である。さらに好ましくは、重量平均分子量が5,000から50,000の共重合体である。また、これらのグリコール酸共重合体の分散度（重量平均分子量/数平均分子量）は約1.2から約4.0が好ましい。特に好ましくは、分散度が約1.5から約3.5の共重合体である。上記（A）のグリコール酸共重合体は、公知の製造法、例えば、特開昭61-28521号公報に記載の方法に従って合成できる。

【0022】ポリ乳酸としては、L-体、D-体およびこれらの混合物の何れでもよいが、D-体/L-体（モル％）が約75/25～約20/80の範囲のものが好ましい。さらに好ましくは、D-体/L-体（モル％）が約60/40～約25/75の範囲のポリ乳酸である。特に好ましくは、D-体/L-体（モル％）が約55/45～約25/75の範囲のポリ乳酸である。該ポリ乳酸は、重量平均分子量が1,500から100,000の範囲のものが好ましい。さらに好ましくは、重量平均分子量が2,000から80,000の範囲のポリ乳酸である。特に好ましくは、重量平均分子量が10,000～60,000（さらに好ましくは、15,000～50,000）の範囲のポリ乳酸である。また、ポリ乳

酸の分散度は約1.2から約4.0が好ましい。特に好ましくは、分散度が約1.5から約3.5の場合である。ポリ乳酸の合成法については、乳酸の二量体であるラクタイドを開環重合する方法と乳酸を脱水重縮合する方法が知られている。

【0023】本発明の製剤基剤におけるグリコール酸共重合体（A）とポリ乳酸（B）は、例えば（A）/（B）で表わされる混合比（重量％）が約10/90～約90/10の範囲で使用される。好ましくは、混合比（重量％）が約20/80～約80/20の範囲である。さらに好ましくは、約30/70～約70/30の範囲である。（A）、（B）のうち何れかの成分が多すぎると、（A）もしくは（B）成分を単独で使用した場合とほとんど同じ薬物放出パターンを有する製剤しか得られず、混合基剤による放出後期の直線的な放出パターンが期待できない。グリコール酸共重合体およびポリ乳酸の分解・消失速度は分子量あるいは組成によって大きく変化するが、一般的にはグリコール酸共重合体の分解・消失速度の方が速いため、混合するポリ乳酸の分子量を大きくする、あるいは（A）/（B）で表わされる混合比を小さくすることによって放出期間を長くすることができる。逆に、混合するポリ乳酸の分子量を小さくすることによって放出期間を短くすることもできる。さらに、一般式〔II〕で示されるヒドロキシカルボン酸の種類や割合を変化させることにより、放出期間を調節することもできる。

【0024】生体内分解性ポリマーとしてポリ乳酸または乳酸-グリコール酸共重合体（以下、単に乳酸-グリコール酸重合体と称す。）を用いる場合、その乳酸/グリコール酸組成比（モル％）は100/0～40/60が好ましく、100/0～45/55がさらに好ましく、とりわけ100/0～50/50が好ましい。上記の乳酸-グリコール酸重合体の重量平均分子量は3,000～100,000が好ましく、さらに5,000～80,000が特に好ましい。また、乳酸-グリコール酸重合体の分散度（重量平均分子量/数平均分子量）は約1.2～約4.0が好ましく、さらに約1.5～約3.5が特に好ましい。乳酸-グリコール酸重合体の分解・消失速度は組成あるいは分子量によって大きく変化するが、一般的にはグリコール酸分率が低いほど分解・消失が遅いため、グリコール酸分率を低くするかあるいは分子量を大きくすることによって放出期間を長くすることができる。逆に、グリコール酸分率を高くするかあるいは分子量を小さくすることによって放出期間を短くすることもできる。長期間（例えば、1～6カ月、好ましくは1～4カ月）型徐放性製剤とするには、上記の組成比および重量平均分子量の範囲の乳酸-グリコール酸重合体が好ましい。上記の組成比および重量平均分子量の範囲の乳酸-グリコール酸重合体よりも分解が早い乳酸-グリ

コール酸重合体を選択すると初期バーストの抑制が困難であり、逆に上記の組成比および重量平均分子量の範囲の乳酸-グリコール酸重合体よりも分解が遅い乳酸-グリコール酸重合体を選択すると有効量の薬物が放出されない期間を生じやすい。

【0025】本明細書における重量平均分子量、数平均分子量および分散度とは、重量平均分子量が120,000、52,000、22,000、9,200、5,050、2,950、1,050、580、162の9種類のポリスチレンを基準物質としてゲルパーミエーションクロマトグラフィー（GPC）で測定したポリスチレン換算の分子量および算出した分散度をいう。測定は、GPCカラムKF804L×2（昭和電工製）、RIモニターL-3300（日立製作所製）を使用、移動相としてクロロホルムを用いた。また、生体内分解性ポリマーをアセトン-メタノール混合溶媒に溶解し、フェノールフタレインを指示薬としてこの溶液をアルコール性水酸化カリウム溶液でカルボキシル基を滴定して末端基定量による数平均分子量を算出した。以下これを末端基定量による数平均分子量と表記する。末端基定量による数平均分子量が絶対値であるのに対してGPC測定による数平均分子量は分析あるいは解析条件（例えば、移動相の種類、カラムの種類、基準物質、スライス幅の選択、ベースラインの選択等）によって変動する相対値であるため、一義的な数値化は困難であるが、例えば乳酸とグリコール酸から無触媒脱水重縮合法で合成され、末端に遊離のカルボキシル基を有する重合体では、GPC測定による数平均分子量と末端基定量による数平均分子量とがほぼ一致する。この乳酸-グリコール酸重合体の場合にほぼ一致するとは、末端基定量による数平均分子量がGPC測定による数平均分子量の約0.5～約2倍の範囲内であることをいい、好ましくは約0.7～約1.5倍の範囲内であることをいう。

【0026】本発明における乳酸-グリコール酸重合体は、乳酸とグリコール酸からの無触媒脱水重縮合（特開昭61-28521号）あるいはラクタイドとグリコライド等の環状体からの触媒を用いた開環重合（Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering Part A: Materials, Volume 2, Marcel Dekker, Inc.1995年）で製造できる。開環重合で合成される重合体は通常はカルボキシル基を有しない重合体であるが、該重合体を化学的に処理して末端を遊離のカルボキシル基にした重合体（ジャーナル オブ コントロールド リリース（J. Controlled Release）, 41巻、249-257頁、1996年）を用いることもできる。上記の末端に遊離のカルボキシル基を有する乳酸-グリコール酸重合体は公知の製造法（例えば無触媒脱水重縮合法、特開昭61-28521号公報参照）で問題なく製造でき、さらには末端に特定されない遊離のカルボキシル基を有する重合体は公知の製造法（例えば、WO94/155

87号公報参照）で製造できる。また、開環重合後の化学的処理によって末端を遊離のカルボキシル基にした乳酸-グリコール酸重合体は例えばベーリングー エンゲルハイム（Boehringer Ingelheim KG）から市販されているものを用いてもよい。

【0027】パモ酸またはその塩としては、市販のパモ酸またはその塩を用いることができる。塩としては、例えば、アルカリ金属塩（例、ナトリウム塩、カリウム塩など）、アルカリ土類金属塩（例、カルシウム塩、マグネシウム塩など）または遷移金属（例、亜鉛、鉄、銅など）との塩などが用いられるが、特に、ナトリウム塩などのアルカリ金属塩が好適である。パモ酸またはその塩の溶液および生理活性ペプチドの溶液に用いられる溶媒としては、例えば、水、アルコール類（例、メタノール、エタノール等）、ビリジン、ジメチルアセトアミド、酢酸などが用いられ、特にメタノールなどのアルコール類が好適である。生理活性ペプチド、パモ酸またはその塩または生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液に用いられる有機溶媒としては、例えば、ハロゲン化炭化水素（例、ジクロロメタン、クロロホルム、ジクロロエタン、トリクロロエタン、四塩化炭素等）、エーテル類（例、エチルエーテル、イソプロピルエーテル等）、脂肪酸エステル（例、酢酸エチル、酢酸ブチル等）、芳香族炭化水素（例、ベンゼン、トルエン、キシレン等）、アルコール類（例、メタノール、エタノール等）などが用いられる。これらは適宜の割合で混合して用いてもよい。なかでも、ハロゲン化炭化水素が好ましく、特にジクロロメタンが好適である。

【0028】

【発明の実施の形態】本発明の製造法は、従来法のように予め生理活性ペプチドのパモ酸塩を形成させることなく、生理活性ペプチドとパモ酸またはその塩とを生体内分解性ポリマーで乳化混合することによって形成した、（i）粒径約0.01～約10 $\mu$ m程度の生理活性ペプチドの微細なパモ酸塩、あるいは（ii）生理活性ペプチド、生体内分解性ポリマーおよびパモ酸またはその塩から形成される複合体または塩を含有する徐放性マイクロファイアを製造することを特徴とするものである。したがって、生体内分解性ポリマーがない条件下で生理活性ペプチドとパモ酸またはその塩とを乳化混合して生理活性ペプチドのパモ酸塩を形成させない限り、生理活性ペプチド、生体内分解性ポリマーおよびパモ酸またはその塩の混合方法は問わない。すなわち、具体的には、本発明は、（1）生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液中で生理活性ペプチドまたはその塩（ただし、パモ酸塩を除く）の溶液とパモ酸またはそのアルカリ金属塩の溶液とを乳化混合した後、溶媒を除去する方法、（2）生理活性ペプチドまたはその塩（ただし、パモ酸塩を除く）、生体内分解性ポリマーおよびパモ酸またはそのアルカリ金属塩を有機溶媒に溶解した後、溶媒を除去する方法、

(3) 生理活性ペプチドまたはその塩(ただし、パモ酸塩を除く)および生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液とパモ酸またはそのアルカリ金属塩の溶液とを乳化混合した後、溶媒を除去する方法、および(4) 生体内分解性ポリマーおよびパモ酸またはそのアルカリ金属塩の有機溶媒溶液と生理活性ペプチドまたはその塩(ただし、パモ酸塩を除く)の溶液とを乳化混合した後、溶媒を除去する方法を提供する。

【0029】本発明の製造法において、混合液中の生理活性ペプチドの濃度は、通常約1～約25重量%、好ましくは約2～約20重量%である。混合液中の生体内分解性ポリマーの濃度は、通常、約1～約25重量%、好ましくは約2～約20重量%である。混合液中のパモ酸またはその塩の濃度は、通常、約0.05～約5重量%、好ましくは約0.2～約4重量%である。パモ酸またはその塩の溶液の使用量は、生理活性ペプチドおよび生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液に対して、通常、約2～約90体積%である。溶媒を除去するためには、次の水中乾燥法、相分離法または噴霧乾燥法が用いられる。本発明の製造法を、各除去法に分けて具体的に説明する。

#### 【0030】(I) 水中乾燥法

生理活性ペプチド(その塩を含む)を生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液に加え、生理活性ペプチドと生体内分解性ポリマーとの有機溶媒溶液を作る。該有機溶媒としては、例えば、ハロゲン化炭化水素(例、ジクロロメタン、クロロホルム、ジクロロエタン、トリクロロエタン、四塩化炭素等)、エーテル類(例、エチルエーテル、イソプロピルエーテル等)、脂肪酸エステル(例、酢酸エチル、酢酸ブチル等)、芳香族炭化水素(例、ベンゼン、トルエン、キシレン等)などが用いられる。これらは適宜の割合で混合して用いてもよい。なかでも、ハロゲン化炭化水素が好ましく、特にジクロロメタンが好適である。また、必要な量の生理活性ペプチドが、生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液の全量に対して体積比にして60%以内の溶媒(例えば、水、アルコール類(例、エタノール、メタノール等)、アセトニトリル、酢酸等)に溶解する場合には、生理活性ペプチドを溶解させた溶液を生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液に添加して、両者の溶液としてもよいし、あるいは生理活性ペプチド溶液を生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液に乳化してO/OまたはW/Oエマルションとする。この際、生理活性ペプチドを析出させることは好ましくない。

【0031】ここで用いる生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液中の濃度は、用いる生体内分解性ポリマーの分子量、有機溶媒の種類等によって異なるが、例えば、ジクロロメタンを有機溶媒として用いた場合、一般的には約0.5～約70重量%、より好ましくは約1～約60重量%、特に好ましくは約2～約50重量%から選ばれ

る。生理活性ペプチドは、通常、上記の生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液1mlに対して生理活性ペプチドが約30mg～約500mg、好ましくは約40mg～約400mgになるように添加する。次いで、生理活性ペプチドと生体内分解性ポリマーとの有機溶媒溶液あるいはO/OまたはW/Oエマルションにパモ酸またはパモ酸塩(例、アルカリ金属塩(ナトリウム塩、カリウム塩など)、アルカリ土類金属塩(例、カルシウム塩、マグネシウム塩など)または遷移金属(例、亜鉛、鉄、銅など)との塩)の溶液(該溶媒としては水、アルコール類(例、メタノール、エタノール等)、ピリジン、ジメチルアセトアミド等)をホモジナイザーあるいは超音波等の公知の方法で乳化しながら添加する。あるいは、生理活性ペプチドあるいはその塩とパモ酸あるいはその塩、さらには生理活性ペプチドのパモ酸塩が有機溶媒(例、アルコール類(メタノール、エタノール等))に完全に溶解する場合には、この有機溶媒溶液を生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液にホモジナイザーあるいは超音波等の公知の方法で乳化しながら添加する。上述の2つの添加法でのパモ酸あるいはパモ酸塩の溶液中濃度は飽和溶解濃度までなら特に限定されないが、好ましくは飽和溶解濃度であり、パモ酸あるいはパモ酸塩の溶液の生体内分解性ポリマーの溶液に対する体積比は約2～約90%が好ましく、さらに好ましくは約5～約70%、特に好ましくは約10～約50%である。

【0032】次いで、得られた生理活性ペプチド、パモ酸を含む生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液(油相)を第2相目の水相中に加え、O(油相)/W(水相)エマルションを形成させた後、油相中の溶媒を蒸発させ、マイクロスフィアを調製する。この際の水相体積は一般的には油相体積の約1倍～約10,000倍、より好ましくは約2倍～約5,000倍、特に好ましくは約5倍～約2,000倍から選ばれる。上記の外水相中に乳化剤を加えてもよい。該乳化剤は、安定なO/Wエマルションを形成できるものであればいずれでもよい。具体的には、例えば、アニオン性界面活性剤(オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウムなど)、非イオン性界面活性剤(ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル〔ツイーン(Tween) 80、ツイーン(Tween) 60、アトラスパウダー社〕、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体〔HCO-60、HCO-50、日光ケミカルズ〕など)、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、カルボキシメチルセルロース、レシチン、ゼラチン、ヒアルロン酸などが挙げられる。これらの中の1種類か、いくつかを組み合わせ使用してもよい。使用の際の濃度は、好ましくは約0.01%～約10重量%の範囲で、さらに好ましくは約0.05%～約5重量%(w/w)の範囲で用いられる。

【0033】上記の外水相中に浸透圧調節剤を加えても

よい。浸透圧調節剤としては、水溶液とした場合に浸透圧を示すものであればよい。該浸透圧調節剤の具体例としては、例えば、多価アルコール類、一価アルコール類、単糖類、二糖類およびオリゴ糖あるいはそれらの誘導体などが挙げられる。上記の多価アルコール類としては、例えば、グリセリン等の二価アルコール類、アラビトール、キシリトール、アドニトール等の五価アルコール類、マンニトール、ソルビトール、ズルシトール等の六価アルコール類などが挙げられる。これらのうち、六価アルコール類が好ましく、なかでもマンニトールが特に好ましい。上記の一価アルコール類としては、例えば、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール等が挙げられ、このうちエタノールが好ましい。上記の単糖類としては、例えば、アラビノース、キシロース、リボース、2-デオキシリボース等の五炭糖類、ブドウ糖、果糖、ガラクトース、マンノース、ソルボース、ラムノース、フコース等の六炭糖類が挙げられ、このうち六炭糖類が好ましい。上記のオリゴ糖としては、例えば、マルトトリオース、ラフィノース糖の三糖類、スタキオース等の四糖類などが挙げられ、このうち三糖類が好ましい。上記の単糖類、二糖類およびオリゴ糖の誘導体としては、例えば、グルコサミン、ガラクトサミン、グルクロン酸、ガラクトツロン酸などが挙げられる。これらの浸透圧調節剤は単独で使用しても、混合して使用してもよい。これらの浸透圧調節剤は、外水相の浸透圧が生理食塩水の浸透圧の約1/50~約5倍、好ましくは約1/25~約3倍となる濃度で用いられる。

【0034】有機溶媒を除去する方法は、公知の方法に従って行うことができる。例えば、プロペラ型攪拌機あるいはマグネチックスターラーなどで攪拌しながら常圧もしくは徐々に減圧にして有機溶媒を蒸発させる方法、ロータリーエヴァポレーターなどを用いて真空度を調節しながら有機溶媒を蒸発させる方法などが挙げられる。このようにして得られたマイクロスフィア（マイクロカプセルと称されることもある）は遠心分離あるいは濾過によって分取した後、マイクロスフィアの表面に付着している生理活性ペプチド、パモ酸、薬物保持物質、乳化剤などを蒸留水で数回繰り返し洗浄し、再び蒸留水などに分散して凍結乾燥する。製造工程中、粒子同士の凝集を防ぐために凝集防止剤を加えてもよい。該凝集防止剤としては、例えば、マンニトール、ラクトース、ブドウ糖、デンプン類（例、コーンスターチ等）などの水溶性多糖、グリシン、フィブリン、コラーゲン等のタンパク質等のタンパク質などが挙げられる。好ましくはマンニトールである。

【0035】また、凍結乾燥後、必要であれば、減圧下マイクロスフィア同士が融着しない条件内で加温してマイクロスフィア中の水分および有機溶媒の除去を行ってもよい。この場合、好ましくは毎分10~20℃の昇温速度の条件下で示差走査熱量計で求めた生体内分解性ポ

リマーの中間点ガラス転移温度よりも若干高い温度で加温する。より好ましくは生体内分解性ポリマーの中間点ガラス転移温度からこれより約30℃高い温度範囲内で加温する。とりわけ、生体内分解性ポリマーとして乳酸-グリコール酸重合体を用いる場合にはその中間点ガラス転移温度以上中間点ガラス転移温度より20℃高い温度範囲、好ましくは、中間点ガラス転移温度以上中間点ガラス転移温度より10℃高い温度範囲で加温する。加温時間はマイクロスフィアの量などによって異なるものの、一般的にはマイクロスフィア自体が所定の温度に達した後、約12時間~約168時間が好ましく、さらに約48時間~約120時間が好ましい。特に、約48時間~約96時間が好ましい。加温方法は、マイクロスフィアの集合が均一に加温できる方法であれば特に限定されない。該加温乾燥方法の好ましい具体例として、例えば、恒温槽、流動槽、移動槽あるいはキルン中で加温乾燥する方法、マイクロ波で加温乾燥する方法などが用いられる。このなかで恒温槽中で加温乾燥する方法が好ましい。

#### 【0036】(I I) 相分離法

本法によってマイクロスフィアを製造する場合には、前記(I)の水中乾燥法に記載した油相にコアセルベーション剤を攪拌下徐々に加えてマイクロスフィアを析出、固化させる。該コアセルベーション剤は油相体積の約0.01~約1,000倍から選ばれる。さらに好ましくは約0.05~約500倍から選ばれる。特に好ましくは約0.1~約200倍から選ばれる。コアセルベーション剤としては、有機溶媒と混和する高分子系、鉱物油系または植物油系の化合物等で生体内分解性ポリマーを溶解しないものであれば特に限定はされない。具体的には、例えば、シリコン油、ゴマ油、大豆油、コーン油、綿実油、ココナッツ油、アマニ油、鉱物油、n-ヘキサン、n-ヘプタンなどが用いられる。これらは2種類以上混合して使用してもよい。このようにして得られたマイクロスフィアを分取した後、ヘプタン等で繰り返し洗浄してコアセルベーション剤等を除去し、減圧乾燥する。もしくは前記(I)の水中乾燥法で記載と同様の方法で洗浄を行った後に凍結乾燥、さらには加温乾燥する。

#### 【0037】(I I I) 噴霧乾燥法

本法によってマイクロスフィアを製造する場合には、前記(I)の水中乾燥法に記載した油相をノズルを用いてスプレードライヤー（噴霧乾燥器）の乾燥室内に噴霧し、極めて短時間内に微粒化液滴内の有機溶媒を揮発させ、マイクロスフィアを調製する。該ノズルとしては例えば二流体ノズル型、圧力ノズル型、回転ディスク型等がある。この後、必要であれば前記(I)の水中乾燥法で記載と同様の方法で洗浄を行った後に凍結乾燥、さらには加温乾燥してもよい。上述のマイクロスフィア以外の剤形としてマイクロスフィアの製造法(I)の水中乾

燥法に記載した油相を、例えば、ロータリーエヴァポレーターなどを用いて真空度を調節しながら有機溶媒および水を蒸発させて乾固した後、ジェットミルなどで粉碎して微粒子としてもよい。さらには、粉碎して得た微粒子をマイクロスフィアの製造法(Ⅰ)の水中乾燥法で記載と同様の方法で洗浄を行った後に凍結乾燥、さらには加温乾燥してもよい。

【0038】マイクロスフィアあるいは微粒子は、そのままあるいはこれを原料物質として種々の剤形に製剤化し、経口又は非経口で投与することができる。具体的には筋肉内、皮下、臓器などへの注射剤または埋め込み剤、鼻腔、直腸、子宮などへの経粘膜剤、経口剤〔例、カプセル剤(例、硬カプセル剤、軟カプセル剤等)、顆粒剤、散剤等の固形製剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等の液剤等〕などとして投与することができる。例えば、マイクロスフィアあるいは微粒子を注射剤とするには、これらを分散剤(例、Tween 80、HCO-60等の界面活性剤、ヒアルロン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム等の多糖類など)、保存剤(例、メチルパラベン、プロピルパラベンなど)、等張化剤(例、塩化ナトリウム、マンニトール、ソルビトール、ブドウ糖、アロリンなど)等と共に水性懸濁剤とするか、ゴマ油、コーン油などの植物油と共に分散して油性懸濁剤として実際に使用できる徐放性注射剤とする。マイクロスフィアあるいは微粒子の粒子径は、懸濁注射剤として使用する場合にはその分散度、通針性を満足する範囲であればよく、例えば、平均粒子径として約0.1~300 $\mu\text{m}$ の範囲が挙げられる。好ましくは、約1~150 $\mu\text{m}$ の範囲の平均粒子径である。さらに好ましくは、約2~100 $\mu\text{m}$ の範囲の平均粒子径である。マイクロスフィアあるいは微粒子を無菌製剤にするには、製造全工程を無菌にする方法、ガンマ線で滅菌する方法、防腐剤を添加する方法等が挙げられるが、特に限定されない。

【0039】本明細書において、マイクロスフィアとは、生理活性ペプチドと生体内分解性ポリマー基剤とを含有する微粒子(マイクロパーティクル)であればよい。特に球状に近いものが好ましい。その具体例としては、例えば1個の粒子中に1個の薬物コアを含有するマイクロカプセル、1個の粒子中に多数の薬物コアを含有する多核マイクロカプセル、または分子状で薬物が固溶体として基剤に溶解あるいは分散しているような微粒子等が挙げられる。本発明の徐放性マイクロスフィアは、上記した本発明の製造法で製造し得る。例えば、上記製造法において、パモ酸と塩を形成し得る塩基性基を有する生理活性ペプチド(特に、該塩基性基を1個有する生理活性ペプチド)を用いた場合、粒径約0.01~約10 $\mu\text{m}$ の生理活性ペプチドの微細なパモ酸塩および生体内分解性ポリマーを含有する徐放性マイクロスフィアを製造することができる。このことによって、予め

生理活性ペプチドのパモ酸塩を形成させた後に生体内分解性ポリマーと混合して該生理活性ペプチドのパモ酸塩を含有する従来のマイクロスフィアの製造法よりも生理活性ペプチドをマイクロスフィア中に高効率で取り込み、高含量で生理活性ペプチドを含有するマイクロスフィアを製造できる。

【0040】一方、パモ酸と塩を形成し得る塩基性基を2個以上有する生理活性ペプチドと遊離のカルボキシル基を有する生体内分解性ポリマーを用いた場合、生理活性ペプチド、パモ酸またはその塩および生体内分解性ポリマーの三者から形成された同様に微細な複合体または塩を含有する徐放性マイクロスフィアを製造することができる。ここでいう三者から成る塩とは、生理活性ペプチドがパモ酸と生体内分解性ポリマーの両者との間に可逆的な結合を介して一体となっていればよく、正塩、酸性塩、塩基性塩、複塩、錯塩等いずれに属する塩であってもよい。また、これら三者が形成しうる複合体のようなものも含む。該塩は、三者が分子分散あるいはこれに近似の状態(例えば、溶液状態)で乳化混合することにより形成され得るものである。この場合、三者の塩を含有する本発明のマイクロスフィア中のパモ酸/生理活性ペプチドのモル比が、従来法で得られるマイクロスフィア中での生理活性ペプチドのパモ酸塩におけるパモ酸/生理活性ペプチドのモル比よりも明らかに小さいという特徴を有し、このことは該塩が従来の生理活性ペプチドのパモ酸塩を用いるマイクロスフィア中のペプチドとは異なる新規な塩であることを示している。本発明の徐放性マイクロスフィアは生理活性ペプチドを高含量で含有しており、製剤からの生理活性ペプチドの徐放性は、生理活性ペプチドまたはそのパモ酸塩の解離、溶解特性並びに生体内分解性ポリマーの分解速度に依存する。

【0041】すなわち、本発明は、(1)粒径約0.01~約10 $\mu\text{m}$ の生理活性ペプチドのパモ酸塩および生体内分解性ポリマーを含有する徐放性マイクロスフィア(A)、および(2)生理活性ペプチド、パモ酸またはその塩および生体内分解性ポリマーの三者から形成される複合体または塩を含有する徐放性マイクロスフィア(B)を提供する。これら徐放性マイクロスフィア(A)および(B)はいずれも、生理活性ペプチド1モルに対してパモ酸を約0.8モル以下、好ましくは約0.1~約0.8モル、より好ましくは約0.2~0.8モル以下、さらに好ましくは約0.3~0.7モルの割合で含有する徐放性マイクロスフィアである。本発明の徐放性マイクロスフィア(A)において、生理活性ペプチド、パモ酸および生体内分解性ポリマーとしては、それぞれ前記と同様のものが用いられる。生理活性ペプチドとしては、パモ酸と塩を形成し得る塩基性基を有する生理活性ペプチドが好ましく、特に、該塩基性基を1個有する生理活性ペプチドが好適である。また、一般式〔Ib〕で表されるLH-RHアゴニストが好ましく、



後述する実施例1に示す化合物C：5-oxo-Pro-His-Trp-Ser-Tyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NH-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>またはその塩（例、酢酸塩）が具体例として挙げられる。生体内分解性ポリマーとしては、ポリ乳酸または $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸重合体が好ましく、特に、ポリ乳酸が好適である。ポリ乳酸の場合、重量平均分子量としては、例えば、10,000～60,000が好ましく、特に、15,000～50,000が好適である。 $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸重合体の場合、乳酸とグリコール酸との組成比としては、例えば、100/0～40/60（モル%）が好ましい。重合体の重量平均分子量としては、例えば、5,000～80,000が好ましい。

【0042】本発明の徐放性マイクロスフィア（A）における生理活性ペプチドのパモ酸塩の粒径は、通常約0.01～約10 $\mu$ m、好ましくは約0.02～約5 $\mu$ m、さらに好ましくは約0.02～約4 $\mu$ mである。本発明の徐放性マイクロスフィア（A）において、通常、生理活性ペプチド1モルに対してパモ酸は約0.8モル以下、好ましくは約0.1～0.8モル、さらに好ましくは約0.2～約0.8モル、特に好ましくは約0.3～約0.7モルの割合で含有される。本発明の徐放性マイクロスフィア（A）における生理活性ペプチド、パモ酸またはその塩および生体内分解性ポリマーの配合量は、生理活性ペプチドの種類によって異なり、また所望の薬理効果および効果の持続期間などによっても選択されるが、生理活性ペプチドの割合は、マイクロスフィア全体に対して、通常約15重量%以上、好ましくは約15～85重量%、より好ましくは約20～約80重量%、さらに好ましくは約20～50重量%である。特に、生理活性ペプチドが5-oxo-Pro-His-Trp-Ser-Tyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NH-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>またはその塩（例、酢酸塩）である場合、該生理活性ペプチドの含有量は、好ましくは約15～約30重量%である。本発明の徐放性マイクロスフィア（A）におけるパモ酸またはその塩の含有量は、マイクロスフィア全体に対して、通常約0.1～約25重量%、好ましくは約0.5～約15重量%、さらに好ましくは約1～約10重量%である。本発明の徐放性マイクロスフィア（A）における生理活性ペプチドのパモ酸塩の含有量は、マイクロスフィア全体に対して、通常約15（または約15.1）～約95重量%、好ましくは約20～約90重量%である。本発明の徐放性マイクロスフィア（A）における生体内分解性ポリマーの含有量は、マイクロスフィア全体に対して、通常約15～約85重量%、好ましくは約30～約60重量%である。本発明の徐放性マイクロスフィア（A）において、通常、生理活性ペプチドはパモ酸と塩を形成しているが、一部の生理活性ペプチドが塩を形成しない状態で存在していてもよい。

【0043】本発明の徐放性マイクロスフィア（B）に

おいて、生理活性ペプチド、パモ酸および生体内分解性ポリマーとしては、それぞれ前記と同様のものが用いられる。生理活性ペプチドとしては、パモ酸と塩を形成し得る塩基性基を2個以上有する生理活性ペプチドが好ましい。なかでも、一般式〔Ia〕で表されるLH-RHアンタゴニストが好ましく、特に、後述する実施例1に示す化合物Aが好適である。生体内分解性ポリマーとしては、 $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸重合体が好ましく、特に、乳酸-グリコール酸重合体が好適である。乳酸とグリコール酸との組成比としては、例えば、100/0～40/60（モル%）が好ましい。重合体の重量平均分子量としては、例えば、5,000～80,000が好ましい。本発明の徐放性マイクロスフィア（B）における生理活性ペプチドのパモ酸塩の粒径は、通常約0.01～約10 $\mu$ m、好ましくは約0.02～約5 $\mu$ m、さらに好ましくは約0.02～約4 $\mu$ mである。本発明の徐放性マイクロスフィア（B）において、通常、生理活性ペプチド1モルに対してパモ酸は約0.8モル以下、好ましくは約0.1～0.8モル、さらに好ましくは約0.2～約0.8モル、特に好ましくは約0.3～約0.7モルの割合で含有される。

【0044】本発明の徐放性マイクロスフィア（B）における生理活性ペプチド、パモ酸またはその塩および生体内分解性ポリマーの配合量は、生理活性ペプチドの種類によって異なり、また所望の薬理効果および効果の持続期間などによっても選択されるが、生理活性ペプチドの含有量は、生理活性ペプチド、パモ酸またはその塩および生体内分解性ポリマーの三者の和としてのマイクロスフィア全体に対して、通常約15重量%以上、好ましくは約15～85重量%、より好ましくは約20～約80重量%、さらに好ましくは約30～80重量%、特に好ましくは約40～80重量%である。本発明の徐放性マイクロスフィア（B）におけるパモ酸またはその塩の含有量は、生理活性ペプチド、パモ酸またはその塩および生体内分解性ポリマーの三者の和としてのマイクロスフィア全体に対して、通常約0.1～約25重量%、好ましくは約0.5～約15重量%、さらに好ましくは約1～約10重量%である。本発明の徐放性マイクロスフィア（B）における生体内分解性ポリマーの含有量は、生理活性ペプチド、パモ酸またはその塩および生体内分解性ポリマーの三者の和としてのマイクロスフィア全体に対して、通常約15～約85重量%、好ましくは約30～約60重量%である。本発明の徐放性マイクロスフィア（B）において、通常、生理活性ペプチドはパモ酸またはその塩および生体内分解性ポリマーとの3者の塩を形成しているが、一部の生理活性ペプチドが塩を形成しない状態で存在していてもよい。生理活性ペプチドのパモ酸塩の粒径は、調製過程の油相あるいはマイクロスフィア断面を光学顕微鏡観察するか、あるいはマイクロスフィア断面（切片）を電子顕微鏡観察して測定す



ることができる。

【0045】本発明の徐放性マイクロスフィアは、各種徐放性製剤として、低毒性でヒトまたは哺乳動物（例、サル、牛、豚、犬、ネコ、マウス、ラット、ウサギ等）に対して安全に用いることができる。徐放性製剤の活性成分としての投与量は、主薬である生理活性ペプチドの種類と含量、剤形、生理活性ペプチド放出の持続時間、対象疾病、対象動物、投与方法などによって種々異なるが、生理活性ペプチドの有効量であればよい。主薬である生理活性ペプチドの1回当たりの投与量としては、例えば、徐放性製剤が1カ月製剤である場合、好ましくは、成人1人（体重50kgとして）当たり約0.001mg～100mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。さらに好ましくは約0.01mg～50mg/kg体重の範囲から、特に好ましくは約0.05mg～10mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。

【0046】より具体的には、前述の一般式〔Ia〕で表わされるLH-RHアンタゴニストまたは一般式〔Ib〕で表わされるLH-RHアゴニストを生理活性ペプチドとして用いる場合、例えば、前立腺癌、前立腺肥大症、子宮内膜症、子宮筋腫、子宮線維腫、思春期早発症、乳癌、膀胱癌、子宮頸部癌、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、大腸癌、胃炎、ホジキン病、悪性黒色腫、移転、多発性骨髄腫、非ホジキン性リンパ腫、非小細胞肺癌、卵巣癌、消化性潰瘍、全身性真菌感染症、小細胞肺癌、心弁膜症、乳腺症、多嚢胞性卵巣、不妊、慢性無排卵症、婦人における適性排卵誘発、ぎそう（アクネ）、無月経（例、続発性無月経）、卵巣および乳房の嚢胞性疾患（多嚢胞性卵巣を含む）、婦人科系の癌、卵巣性高アンドロゲン血症および多毛症、胸腺幼若化を介したT細胞産生によるAIDS、男性性犯罪者の治療のための男性避妊等のホルモン依存性疾患の治療・予防剤、避妊、月経前症候群（PMS）の症状軽減のための薬剤、体外受精（IVF）用剤などとして、特に、前立腺癌、前立腺肥大症、子宮内膜症、子宮筋腫、子宮線維腫、思春期早発症などの治療・予防剤や避妊薬として使用することができる。該生理活性ペプチドの投与量は、その剤形、所望の薬物放出持続時間、対象疾病、対象動物などによって種々異なるが、薬物の有効量であればよい。薬物の1回当たりの投与量としては、例えば徐放性製剤癌1カ月製剤である場合、好ましくは、成人1人当たり約0.005mg～約10mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。さらに好ましくは、約0.02mg～約5mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。1回当たりの徐放性製剤におけるマイクロスフィア投与量は成人1人当たり好ましくは、約0.005mg～50mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。さらに好ましくは約0.02mg～30mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。投与回数は、数週間に1回、1か月に1回、あるいは数か月に1回等、主薬である生理活性ペプ

チドの種類と含量、剤形、生理活性ペプチド放出の持続時間、対象疾病、対象動物などによって適宜選ぶことができる。

【0047】

【実施例】以下に実施例、比較例および実験例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

【実施例1】N-(S)-2-テトラヒドロフロイル-Gly-D2Nal-D4C1Phe-D3Pal-Ser-NMeTyr-DLys(Nic)-Leu-Lys(Nisp)-Pro-DAlaNH<sub>2</sub>（以下、化合物Aと称する）の酢酸塩（TAP社製）972mgと乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸/グリコール酸=50/50（モル%）、重量平均分子量6,150、数平均分子量2,400、末端基定量による数平均分子量2,300、和光純薬工業製）1040mgとをジクロロメタン3mlに溶解した液に、パモ酸100mgを溶解したピリジン2.7mlを加えて（添加パモ酸/化合物Aモル比0.5）、小型ホモジナイザーで60秒間乳化混合し、S/Oサスペンションを得た。このサスペンションを18℃に冷却した後、予め18℃に調節しておいた5%マンニトール含有0.1重量%ポリビニルアルコール（EG-40、日本合成化学製）水溶液400ml中に注入し、タービン型ホモミキサーを用い、7,000rpmでS/O/Wエマルジョンとした。このS/O/Wエマルジョンを室温で3時間攪拌してジクロロメタンを揮散させ、油相を固化させた後、遠心分離機（05PR-22、日立製作所）を用いて2,000rpmで捕集した。これを再び蒸留水に分散後、さらに遠心分離を行い、遊離薬物等を洗浄した。捕集されたマイクロカプセルは少量の蒸留水を加えて再分散後、凍結乾燥して粉末として得られた。マイクロカプセル中への化合物Aの封入率は90.2%で、マイクロカプセル中の化合物A含量およびパモ酸/化合物Aモル比はそれぞれ38.6重量%、0.49であった。

【0048】

【実施例2】実施例1中の乳酸-グリコール酸共重合体を乳酸/グリコール酸=50/50（モル%）、重量平均分子量10,100、数平均分子量3,720、末端基定量による数平均分子量3,500の乳酸-グリコール酸共重合体に変更し、ジクロロメタン量を3.5mlに変更した以外実施例1と同様にしてマイクロカプセルを得た。この際の添加パモ酸/化合物Aモル比は0.5であった。マイクロカプセル中への化合物Aの封入率は91.8%で、マイクロカプセル中の化合物A含量およびパモ酸/化合物Aモル比はそれぞれ39.2重量%、0.51であった。

【0049】

【実施例3】実施例1中の乳酸-グリコール酸共重合体を乳酸/グリコール酸=50/50（モル%）、重量平均分子量12,700、数平均分子量4,780、末端基

定量による数平均分子量4,900の乳酸-グリコール酸共重合体に変更し、ジクロロメタン量を3.8mlに変更した以外は実施例1と同様にしてマイクロカプセルを得た。この際の添加パモ酸/化合物Aモル比は0.5であった。マイクロカプセル中への化合物Aの封入率は89.9%で、マイクロカプセル中の化合物A含量およびパモ酸/化合物Aモル比はそれぞれ38.4重量%、0.53であった。

【実施例4】実施例1中のパモ酸量およびピリジン量を200mgと5mlにそれぞれ変更した以外は実施例3と同様にしてマイクロカプセルを得た。この際の添加パモ酸/化合物Aモル比は1.0であった。マイクロカプセル中への化合物Aの封入率は94.1%で、マイクロカプセル中の化合物A含量およびパモ酸/化合物Aモル比はそれぞれ38.3重量%、0.63であった。

#### 【0050】

【実施例5】化合物Aの酢酸塩（TAP社製）972mgと乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸/グリコール酸=50/50（モル%）、重量平均分子量12,700、数平均分子量4,780、末端基定量による数平均分子量4,900、和光純薬工業製）1040mgとをジクロロメタン4mlに溶解した液に、パモ酸ジナトリウム 112mgを溶解した蒸留水0.9mlを加えて（添加パモ酸/化合物Aモル比0.5）、小型ホモジナイザーで60秒間乳化混合し、S/Oサスペンション（またはW/Oエマルション）を得た。このサスペンションを18℃に冷却した後、予め18℃に調節しておいた5%マンニトール含有0.1重量%ポリビニルアルコール（EG-40、日本合成化学製）水溶液400ml中に注入し、タービン型ホモミキサーを用い、7,000rpmでS/O/Wエマルションとした。このS/O/Wエマルションを室温で3時間攪拌してジクロロメタンを揮散させ、油相を固化させた後、遠心分離機（05PR-22、日立製作所）を用いて2,000rpmで捕集した。これを再び蒸留水に分散後、さらに遠心分離を行い、遊離薬物等を洗浄した。捕集されたマイクロカプセルは少量の蒸留水を加えて再分散後、凍結乾燥して粉末として得られた。マイクロカプセル中への化合物Aの封入率は89.8%で、マイクロカプセル中の化合物A含量およびパモ酸/化合物Aモル比はそれぞれ38.4重量%、0.56であった。

#### 【0051】

【実施例6】実施例5中の乳酸-グリコール酸共重合体を乳酸/グリコール酸=65/35（モル%）、重量平均分子量12,500、数平均分子量4,170、末端基定量による数平均分子量4,000の乳酸-グリコール酸共重合体に変更し、ジクロロメタン量を4.5mlに変更した以外は実施例5と同様にしてマイクロカプセルを得た。この際の添加パモ酸/化合物Aモル比は0.5であった。マイクロカプセル中への化合物Aの封入率は8

9.6%で、マイクロカプセル中の化合物A含量およびパモ酸/化合物Aモル比はそれぞれ38.3重量%、0.57であった。

#### 【0052】

【実施例7】化合物Aの酢酸塩（TAP社製）4.06gと乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸/グリコール酸=50/50（モル%）、重量平均分子量12,700、数平均分子量4,780、末端基定量による数平均分子量4,900、和光純薬工業製）4gとをジクロロメタン16mlに溶解した液に、パモ酸ジナトリウム0.45gを溶解した蒸留水3.6mlを加えて（添加パモ酸/化合物Aモル比0.5）、小型ホモジナイザーで60秒間乳化混合し、S/Oサスペンション（またはW/Oエマルション）を得た。このサスペンションを18℃に冷却した後、予め18℃に調節しておいた5%マンニトール含有0.1重量%ポリビニルアルコール（EG-40、日本合成化学製）水溶液1600ml中に注入し、タービン型ホモミキサーを用い、7,000rpmでS/O/Wエマルションとした。このS/O/Wエマルションを室温で3時間攪拌してジクロロメタンを揮散させ、油相を固化させた後、遠心分離機（05PR-22、日立製作所）を用いて2,000rpmで捕集した。これを再び蒸留水に分散後、さらに遠心分離を行い、遊離薬物等を洗浄した。捕集されたマイクロカプセルは少量の蒸留水を加えて再分散後、凍結乾燥して粉末として得られた。その後、40℃の恒温槽中で96時間減圧乾燥した。得られた平均粒径22μmのマイクロカプセル中への化合物Aの封入率は93.8%で、マイクロカプセル中の化合物A含量およびパモ酸/化合物Aモル比はそれぞれ41.0重量%、0.52であった。

#### 【0053】

【実施例8】N<sub>2</sub>Ac-D<sub>2</sub>Nal-D<sub>4</sub>ClPhe-D<sub>3</sub>Pal-Ser-NMeTyr-D<sub>2</sub>Lys(Nic)-Leu-Lys(Nisp)-Pro-D<sub>2</sub>AlaNH<sub>2</sub>（以下、化合物Bと称する）の酢酸塩（TAP社製）2gと乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸/グリコール酸=50/50（モル%）、重量平均分子量12,700、数平均分子量4,780、末端基定量による数平均分子量4,900、和光純薬工業製）2gとをジクロロメタン9mlに溶解した液に、パモ酸ジナトリウム0.224gを溶解した蒸留水1.8mlを加えて（化合物B酢酸塩中の化合物B量を86.7%として換算した添加パモ酸/化合物Bモル比0.5）、小型ホモジナイザーで60秒間乳化混合し、S/Oサスペンション（またはW/Oエマルション）を得た。このサスペンションを18℃に冷却した後、予め18℃に調節しておいた5%マンニトール含有0.1重量%ポリビニルアルコール（EG-40、日本合成化学製）水溶液800ml中に注入し、タービン型ホモミキサーを用い、7,000rpmでS/O/Wエマルションとした。このS/O/Wエマルションを室温で3時間攪拌してジクロロメ

タンを揮散させ、油相を固化させた後、遠心分離機（05PR-22、日立製作所）を用いて2,000rpmで捕集した。これを再び蒸留水に分散後、さらに遠心分離を行い、遊離薬物等を洗浄した。捕集されたマイクロカプセルは少量の蒸留水を加えて再分散後、凍結乾燥して粉末として得られた。マイクロカプセル中への化合物Bの封入率は98.9%で、マイクロカプセル中の化合物B含量およびパモ酸／化合物Bモル比はそれぞれ43.6重量%、0.52であった。

#### 【0054】

【実施例9】化合物Aの酢酸塩（TAP社製）1.012gとパモ酸ジナトリウム0.112g（添加パモ酸／化合物Aモル比0.5）とをメタノール6mlに溶解した液に、乳酸－グリコール酸共重合体（乳酸／グリコール酸＝50／50（モル%）、重量平均分子量18,700、数平均分子量6,180、末端基定量による数平均分子量6,000、和光純薬工業製）0.47gを溶解したジクロロメタン15mlを加えて均一溶液を得た。この均一溶液をロータリーエヴァポレーターで有機溶媒を除去して乾固した後、75 $\mu$ m以下に粉碎した。粉碎して得た微粉末を再び蒸留水に分散後、さらに遠心分離（3,000rpm）を行い、遊離薬物等を洗浄した。捕集された微粉末は少量の蒸留水を加えて再分散後、凍結乾燥して粉末として得られた。微粉末中への化合物Aの封入率は94.4%で、微粉末中の化合物A含量およびパモ酸／化合物Aモル比はそれぞれ56.5重量%、0.60であった。

#### 【0055】

【実施例10】化合物Aの酢酸塩（TAP社製）0.506gとパモ酸ジナトリウム0.056g（添加パモ酸／化合物Aモル比0.5）とをメタノール3mlに溶解した液に、乳酸－グリコール酸共重合体（乳酸／グリコール酸＝50／50（モル%）、重量平均分子量12,700、数平均分子量4,780、末端基定量による数平均分子量4,900、和光純薬工業製）0.056gを溶解したジクロロメタン6mlを加えて均一溶液を得た。この均一溶液をロータリーエヴァポレーターで有機溶媒を除去して乾固した後、75 $\mu$ m以下に粉碎した。粉碎して得た微粉末を再び蒸留水に分散後、さらに遠心分離（3,000rpm）を行い、遊離薬物等を洗浄した。捕集された微粉末は少量の蒸留水を加えて再分散後、凍結乾燥して粉末として得られた。微粉末中への化合物Aの封入率は94.6%で、微粉末中の化合物A含量およびパモ酸／化合物Aモル比はそれぞれ75.7重量%、0.60であった。

#### 【0056】

【比較例1】9.4225gの化合物Aの酢酸塩を溶解した水溶液に、1.942gのパモ酸を溶解した水酸化ナトリウム水溶液を撹拌下滴下し（添加パモ酸／化合物Aモル比1.0）、沈殿物として化合物Aのパモ酸

塩を得た。得られた沈殿物を大過剰の水で洗浄後、凍結乾燥した。HPLCでそれぞれを定量した結果、凍結乾燥粉末中のパモ酸／化合物Aモル比は1.08であった。

【比較例2】54.03mgのパモ酸ジナトリウム塩を溶解した水溶液に235.5mgの化合物Aの酢酸塩を溶解した水溶液を撹拌下滴下し（添加パモ酸／化合物Aモル比1.0）、沈殿物として化合物Aのパモ酸塩を得た。得られた沈殿物を大過剰の水で洗浄後、凍結乾燥した。HPLCでそれぞれを定量した結果、凍結乾燥粉末中のパモ酸／化合物Aモル比は1.17であった。

#### 【0057】

【比較例3】27.02mgのパモ酸ジナトリウム塩を溶解した水溶液に245.2mgの化合物Aの酢酸塩を溶解した水溶液を撹拌下滴下し（添加パモ酸／化合物Aモル比0.5）、沈殿物として化合物Aのパモ酸塩を得た。得られた沈殿物を大過剰の水で洗浄後、凍結乾燥した。HPLCでそれぞれを定量した結果、凍結乾燥粉末中のパモ酸／化合物Aモル比は1.26であった。

【比較例4】比較例1の化合物Aのパモ酸塩を分級し、平均粒子径14 $\mu$ mのパモ酸塩を用いて以下のようにマイクロカプセルを調製した。乳酸－グリコール酸共重合体（乳酸／グリコール酸＝50／50（モル%）、重量平均分子量12,700、数平均分子量4,780、末端基定量による数平均分子量4,500）1.04gをジクロロメタン4mlに溶解した液に化合物Aのパモ酸塩（パモ酸／化合物Aモル比1.08）を加え、小型ホモジナイザーで乳化してS/Oサスペンションとし、このサスペンションを用いて以下実施例1と同様にしてマイクロカプセルを得た。マイクロカプセル中への化合物Aの封入率は15%と低値で、マイクロカプセル中の化合物A含量は6.1重量%であった。マイクロカプセル中でのパモ酸／化合物Aモル比は1.12と封入前と同値であったことから、化合物Aはパモ酸塩のままマイクロカプセルに封入され、乳酸－グリコール酸重合体の塩とはなっていないと判断できる。

#### 【0058】

【比較例5】実施例1中のパモ酸およびビリジンをいかなかった以外実施例3と同様にしてマイクロカプセルを得た。マイクロカプセル中への化合物Aの封入率は41.1%で、マイクロカプセル中の化合物A含量は18.5重量%であった。

【比較例6】108.06mgのパモ酸ジナトリウム塩を溶解した水溶液に221.4mgの化合物Bの酢酸塩を溶解した水溶液を撹拌下滴下し（添加パモ酸／化合物Bモル比2.0）、沈殿物として化合物Bのパモ酸塩を得た。得られた沈殿物を大過剰の水で洗浄後、凍結乾燥した。HPLCでそれぞれを定量し、化合物B酢酸塩中の化合物B量を86.7%として算出すると、凍結乾燥粉末中のパモ酸／化合物Bモル比は1.11であった。

## 【0059】

【実験例1】実施例1～7で得られた各マイクロカプセルあるいは比較例1で得られた化合物Aパモ酸塩を25～75 $\mu$ mに分級したものの約6mgをそれぞれ0.5mlの分散媒（0.25mgのカルボキシメチルセルロース、0.5mgのポリソルベート80、25mgのマンニトールを溶解した蒸留水）に分散して6～8週齢雄性SDラットの背部皮下に22G注射針で投与した。投与後ラットを屠殺して投与部位に残存するマイクロカプセルあるいはパモ酸塩を取り出し、この中の化合物Aを定量したその結果を〔表1〕に示す。

## 【0060】

【表1】

	1週	2週	3週	4週
実施例1	46%	22%	14%	10%
実施例2	56%	27%	16%	13%
実施例3	63%	35%	19%	12%
実施例4	51%	35%	20%	15%
実施例5	63%	33%	16%	9%
実施例6	63%	36%	21%	12%
実施例7	67%	28%	22%	5%
比較例1	40%	18%	13%	4%

## 【0061】

【実施例11】5-oxo-Pro-His-Trp-Ser-Tyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NH-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>の酢酸塩（武田薬品工業製、以下化合物Cと称する）500mgを溶解した蒸留水0.45mlにポリ乳酸（重量平均分子量50,000、数平均分子量25,000、多木化学製）1800mgをジクロロメタン7.5mlに溶解した液を加えて小型ホモジナイザーで60秒間乳化混合して、W/Oエマルジョンとした後、このW/Oエマルジョンにパモ酸ジナトリウム85mgを溶解したメタノール0.85mlを加えて小型ホモジナイザーで再度60秒間混合し、S/Oサスペンションを得た。このサスペンションを18℃に冷却した後、予め18℃に調節しておいた5%マンニトール含有0.1重量%ポリビニルアルコール（EG-40、日本合成化学製）水溶液400ml中に注入し、タービン型ホモミキサーを用い、7,000rpmでS/O/Wエマルジョンとした。このS/O/Wエマルジョンを室温で3時間攪拌してジクロロメタンを揮散させ、油相を固化させた後、遠心分離機（05PR-22、日立製作所）を用いて2,000rpmで捕集した。これを再び蒸留水に分散後、さらに遠心分離を行い、遊離薬物等を洗浄した。捕集されたマイクロカプセルは少量の蒸留水を加えて再分散後、凍結乾燥して粉末として得られた。マイクロカプセル中への化合物Cの封入率は86.4%で、マイクロカプセル中の化合物C含

量およびパモ酸/化合物Cモル比はそれぞれ18.2重量%、0.50であった。

## 【0062】

【実施例12】実施例11中のポリ乳酸を重量平均分子量17,000、数平均分子量5,000、末端基定量による数平均分子量5,500のポリ乳酸（和光純薬工業製）1500mgに、ジクロロメタン量を8mlに、パモ酸ジナトリウムのメタノール溶液を蒸留水溶液

（1.1ml）にそれぞれ変更した以外は実施例11と同様にしてマイクロカプセルを得た。マイクロカプセル中の化合物Cの封入率は92.8%で、マイクロカプセル中の化合物C含量およびパモ酸/化合物Cモル比はそれぞれ21.9重量%、0.78であった。

【実施例13】化合物C 1000mgを溶解した蒸留水0.9mlにポリ乳酸（重量平均分子量24,300、数平均分子量7,790、末端基定量による数平均分子量8,000、和光純薬工業製）3600mgをジクロロメタン8mlに溶解した液を加えて小型ホモジナイザーで60秒間乳化混合してW/Oエマルジョンとして後、このW/Oエマルジョンにパモ酸ジナトリウム204mgを溶解したメタノール2mlを加えて小型ホモジナイザーで再度60秒間乳化混合し、ほとんど澄明でかすかに濁った黄色の溶液を得た。この黄色溶液を18℃に冷却した後、予め18℃に調節しておいた5%マンニトール含有0.1重量%ポリビニルアルコール（EG-40、日本合成化学製）水溶液800ml中に注入し、タービン型ホモミキサーを用い、7,000rpmでO/Wエマルジョンとした。このO/Wエマルジョンを室温で3時間攪拌してジクロロメタンを揮散させ、油相を固化させた後、遠心分離機（05PR-22、日立製作所）を用いて2,000rpmで捕集した。これを再び蒸留水に分散後、さらに遠心分離を行い、遊離薬物等を洗浄した。捕集されたマイクロカプセルは少量の蒸留水を加えて再分散後、凍結乾燥して粉末として得られた。得られた平均粒子径25 $\mu$ mのマイクロカプセル中への化合物Cの封入率は100.0%で、マイクロカプセル中の化合物C含量およびパモ酸/化合物Cモル比はそれぞれ20.9重量%、0.57であった。

## 【0063】

【実施例14】実施例13中のポリ乳酸を重量平均分子量40,000、数平均分子量26,700のポリ乳酸（多木化学製）に、ジクロロメタン量を9mlにそれぞれ変更した以外は実施例13と同様にして得た黄色溶液を用いて、以下実施例13と同様の操作でマイクロカプセルを得た。マイクロカプセル中への化合物Cの封入率は100.3%で、マイクロカプセル中の化合物C含量およびパモ酸/化合物Cモル比はそれぞれ21.0重量%、0.56であった。

【実施例15】ポリ乳酸量、ジクロロメタン量、パモ酸ジナトリウム量およびメタノール量をそれぞれ5,00

0mg、10ml、130mgおよび1.3mlに変更して得たW/Oエマルションを用いた以外は実施例13と同様の操作でマイクロカプセルを得た。得られたマイクロカプセルを55℃の恒温槽中で120時間減圧乾燥した。マイクロカプセル中への化合物Cの封入率は100.0%でマイクロカプセル中の化合物C含量およびパモ酸/化合物Cモル比はそれぞれ16.4重量%、0.39であった。

【比較例7】実施例11中のパモ酸ジナトリウムのメタノール溶液を添加しなかった以外は実施例11と同様にしてマイクロカプセルを得た。得られたマイクロカプセル中の化合物含量は7.7重量%と低い値であった。

【0064】

【比較例8】500mgのパモ酸ジナトリウム塩を溶解した水溶液に2936.5mgの化合物Cを溶解した水溶液を攪拌下、滴下し（添加パモ酸/化合物Cモル比0.5）、沈殿物としてパモ酸塩を得た。得られた沈殿物を大過剰の水で洗浄後、凍結乾燥した。HPLCでそれぞ

れを定量した結果、凍結乾燥粉末中のパモ酸/化合物Cモル比は0.87であった、これを分級して得た平均粒子径10 $\mu$ mのパモ酸塩を化合物Cが実施例11と同量になるようにして添加し、化合物Cの水溶液およびパモ酸ジナトリウムのメタノール溶液を添加しなかった以外は実施例11と同様にしてマイクロカプセルを得た。すなわち、別途調製した化合物Cのパモ酸塩を分散した油相を用いて水中乾燥法でマイクロカプセルを調製した。マイクロカプセル中の化合物C含量は7.4重量%と低い値であった。

【比較例9】実施例12中のパモ酸ジナトリウムの蒸留水溶液を添加しなかった以外は実施例12と同様にしてマイクロカプセルを得た。得られたマイクロカプセル中の化合物含量は11.3重量%と低い値であった。

【0065】

【発明の効果】本発明によれば、生理活性ペプチドの含量が高く、生理活性ペプチドの放出性を制御する徐放性マイクロスフィアを提供することができる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I
A 6 1 K 38/22		A 6 1 K 37/30
38/11	A C J	37/32
38/27	A C Z	37/34
38/24		37/36
38/35		37/38
47/46		37/40

(72)発明者 猪狩 康孝  
兵庫県神戸市東灘区本山南町5丁目4番25  
-503号